

# UPLC-MS/MS法鉴定五味子酯甲在大鼠体内的代谢产物<sup>Δ</sup>

苏红宁<sup>1\*</sup>,李淳瑞<sup>2</sup>,王玉峰<sup>2</sup>,赵韶华<sup>2</sup>,刘敏彦<sup>2#</sup>(1.石家庄市第四医院,石家庄 050017;2.石家庄以岭药业股份有限公司,石家庄 050035)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1759-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.09

**摘要** 目的:鉴定大鼠给予五味子酯甲后尿样中的代谢产物,阐明五味子酯甲在大鼠体内的代谢途径。方法:采用超高效液相色谱-串联四极杆质谱(UPLC-MS/MS)法与MetabolitePilot 1.5代谢物分析软件进行分析鉴定。色谱柱为Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液(梯度洗脱),柱温为50℃,流速为0.4 ml/min,进样体积为5 μl。一级全扫描范围100~1 000 amu,累积时间200 ms;子离子扫描范围50~1 000 amu,累积时间80 ms。大鼠ig给予五味子酯甲(15 mg/kg),收集并分析给药前后的尿样。结果:共鉴定代谢产物7种(M1~M7),即五味子醇乙、14-OH-五味子醇乙、1-OH-五味子醇乙或3-OH-五味子醇乙、2-OH-五味子醇乙、7-脱羟基-五味子醇乙、7-甲氧基-五味子醇乙。结论:该研究首次报道了五味子酯甲在大鼠体内的代谢物质,均为I相代谢产物;其在大鼠体内的主要代谢途径是脱去苯甲酸,发生氧化反应和还原反应。

**关键词** 超高效液相色谱-串联四极杆质谱法;五味子酯甲;大鼠;代谢产物;代谢途径

## Identification of Metabolites of Schisantherin A in Rats *in vivo* by UPLC-MS/MS

SU Hong-ning<sup>1</sup>, LI Chun-rui<sup>2</sup>, WANG Yu-feng<sup>2</sup>, ZHAO Shao-hua<sup>2</sup>, LIU Min-yan<sup>2</sup>(1.The Fourth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050017, China; 2.Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To identify the metabolites of schisantherin A in the urine of the rats given schisantherin A, and explain the metabolic pathway of schisantherin A in rats *in vivo*. METHODS: UPLC-MS/MS and MetabolitePilot 1.5 for metabolites analysis software were used for analysis and identification. The column was Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> with the mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid solution (gradient elution), at the flow rate of 0.4 ml/min, with the column temperature of 50 °C and the volume of 5 μl. The primary full scan had a scope of 100-1 000 amu with the cumulative time of 200 ms, and daughter ion scan had a scope of 50-1 000 amu with the cumulative time of 80 ms. The rats were given schisantherin A (15 mg/kg), ig, and the urine sample was collected and analyzed before and after the administration. RESULTS: Totally 7 kinds of metabolites were identified, including schizandrol B, 14-OH-schizandrol B, 2-OH-schizandrol B, 1-OH-schizandrol B or 3-OH-schizandrol B, 7-dehydroxylation-schizandrol B and 7-methoxyl-schizandrol B. CONCLUSIONS: The study is the first one to report the metabolites of schisantherin A in rats *in vivo*, all of which are phase I metabolites and the main metabolic pathways of schisantherin A are oxidation and reduction reactions by removing of benzoic acid.

**KEYWORDS** UPLC-MS/MS; Schisantherin A; Rats; Metabolites; Metabolic pathway

五味子酯甲(Schisantherin A)为木兰科植物南五味子和北五味子的主要有效成分<sup>[1-4]</sup>,具有保肝、抗癌、抗氧化、抗病毒等广泛的药理作用<sup>[5-7]</sup>。近年来,与五味子酯甲相关的药理学研究报道较多<sup>[8-9]</sup>,然而其代谢研究却鲜见报道。高分辨质谱(HRMS)能够为已知化合物和未知化合物提供一级全扫描和丰富的二级质谱(MS)信息,以其高灵敏度和高分辨率等特点成为复杂生物体系中化学成分分离和鉴定的有力工具<sup>[10-12]</sup>。本研究应用超高效液相色谱-串联四极杆MS(UPLC-Q-TOF-MS/MS,以下简称UPLC-MS/MS)技术对大鼠ig给予五味子酯甲后的体内代谢产物进行了分离鉴定,根据MS裂解规律,推测代谢物的化学结构,总结了代谢途径,可为五味子酯甲的

发应用提供参考。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

1290型超高效液相色谱系统(美国Agilent公司);5600型MS仪、1.6数据采集软件、MetabolitePilot 1.5(美国AB公司);AG-135型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);GT16-3型高速离心机(北京时代北利离心机有限公司);ZH-2型混合器(天津药典标准仪器厂)。

#### 1.2 药品与试剂

五味子酯甲对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111529-200604,纯度:>98%,用于质谱分析);五味子酯甲原料药(批号:MUST-12110606,纯度:>95%,用于动物实验)、五味子醇乙对照品(批号:MUST-12051603,纯度:>98%,用于质谱分析)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;乙腈(色谱纯,美国Fisher公司);甲酸(色谱纯,美国Diamond公司);甲醇(分析纯,天津科密欧试剂公司),水为重蒸水。

#### 1.3 动物

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家科技重大专项子课题资助项目(No.2011ZX09201-201-28)

\* 主管药师。研究方向:中药质量控制、药动学。电话:0311-85901712

# 通信作者:副主任中药师,博士。研究方向:药物质量控制、药动学。E-mail: liuminyan75@163.com

清洁级SD大鼠6只, ♂, 体质量(275 ± 25) g, 由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所提供[实验动物使用许可证号: SCXK(京)2009-0017]。大鼠饲养条件: 分别饲养在不同的代谢笼中, 温度(22 ± 2) °C, 湿度(55 ± 5)%, 自由饮水, 每天给予12 h光照。

## 2 方法

### 2.1 对照品溶液的制备

精密称取五味子酯甲、五味子醇乙对照品适量, 用甲醇溶解, 制备对照品贮备液; 用0.1%甲酸-甲醇(1:1, V/V)溶液稀释上述贮备液制备成质量浓度为15 ng/ml的对照品溶液, 用于MS分析。

### 2.2 实验分组与给药

6只SD大鼠随机均分为空白[等容0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液]组与给药(五味子酯甲, 15 mg/kg)组。ig给药1次, 于给药前12 h禁食。用药依据源自预实验。

### 2.3 大鼠尿样的收集

大鼠ig给药后, 分别收集0~48 h的尿液, -40 °C贮藏。

### 2.4 大鼠尿样的预处理

分别将大鼠尿样加在不同的Waters Sep-Pak® Vac 3cc C<sub>18</sub>固相萃取小柱上(加样前用5 ml 甲醇和5 ml 水预洗), 先用水2 ml 洗涤, 再用甲醇2 ml 洗脱, 收集甲醇洗脱液, 合并, 40 °C 氮气流吹干, 残渣再用1 ml 甲醇溶解, 10 300×g 离心10 min, 精密吸取上清液5 μl, 进行检测。

### 2.5 分析条件

2.5.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~2 min, 5% A; 2~20 min, 5% →40% A; 20~30 min, 40% →70% A; 30~40 min, 70% →100% A); 流速: 0.4 ml/min; 柱温: 50 °C; 进样前平衡时间: 5 min; 进样体积: 5 μl。

2.5.2 质谱条件 离子源: 电喷雾离子化源(ESI); 源喷射电压(IS): 5 500 V, 正离子检测模式; 雾化温度: 550 °C; 解簇电压(DP): 60 V; 碰撞能量(CE): 45 eV; 雾化气压力(Gas1, N<sub>2</sub>): 55 psi, 辅助气压力(Gas2, N<sub>2</sub>): 55 psi, 气帘气压力(Cur, N<sub>2</sub>): 35 psi; 一级全扫描范围: 100~1 000 amu, 累积时间: 200 ms。IDA参数: 永远不排除监测相同质荷比(m/z)的离子, 开启动态背景扣除(DBS), 且对每个时间8个响应值超过100 cps的峰进行进行子离子扫描; 子离子扫描范围: 50~1 000 amu, 累积时间: 80 ms; 碰撞能量扩展(CES): 15 eV。试验过程采用自动校准(CDS)。

### 2.6 分析方法

采用MetabolitePilot 1.5代谢物分析软件, 根据TOF-MS检测的准确分子质量、质谱碎片信息、同位素组成等对五味子酯甲可能存在的代谢产物进行分析。

## 3 结果

共鉴定出7种代谢产物。空白尿样和给药后尿样的MS图见图1。

### 3.1 五味子酯甲MS裂解分析

五味子酯甲(C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>O<sub>9</sub>), 保留时间为29.64 min, 正离子准分子离子峰m/z为537.207 7[M+H]<sup>+</sup>; 在MS中, C-6位甲氧键断裂失去1分子苯甲酸(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COOH)产生碎片m/z 415.173 6, 再分别失去C-7位H<sub>2</sub>O、HCHO或CH<sub>3</sub>CHO分别产生碎片m/z 397.164 1、385.163 3或371.148 3, 继续断裂丢失1分子3-CH<sub>3</sub>

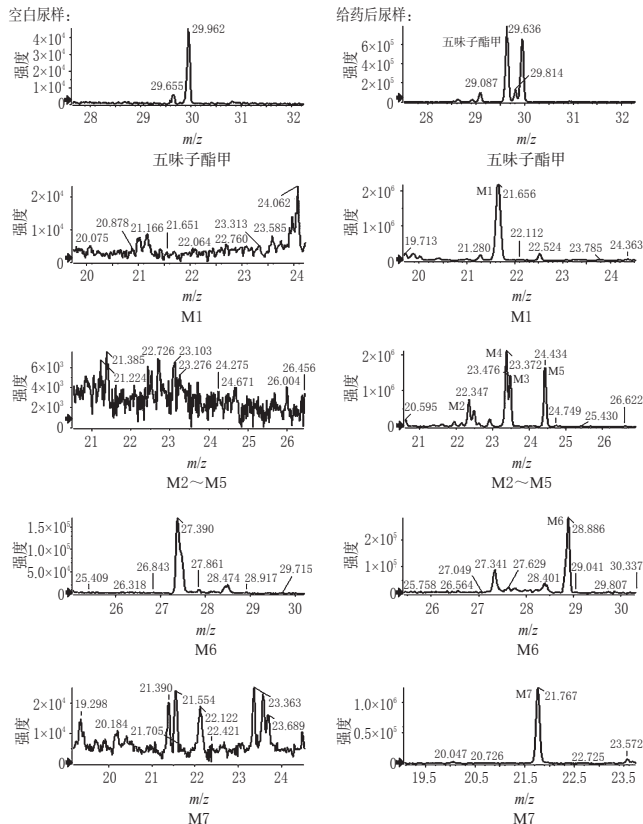


图1 空白尿样和给药后尿样的MS图

Fig 1 MS spectrums of blank urine sample and the urine sample after drug administration

或2-OCH<sub>3</sub>分别产生碎片m/z 356.123 8和340.129 8, 再丢失1分子CH<sub>3</sub>或OCH<sub>3</sub>分别产生碎片m/z 325.106 6和309.111 2; 碎片离子m/z 415.173 6中联苯环断裂失去1分子C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>产生碎片m/z 373.127 4, 再失去2-OCH<sub>3</sub>产生碎片m/z 342.109 0; 对于MS中出现的碎片m/z 437.155 9, 经结构分析, 无法确定, 文献亦未解释清楚, 还有待进一步研究。五味子酯甲的化学结构式、MS图见图2、图3。

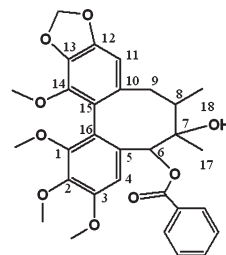


图2 五味子酯甲的化学结构式

Fig 2 Chemical structural formula of schisantherin A

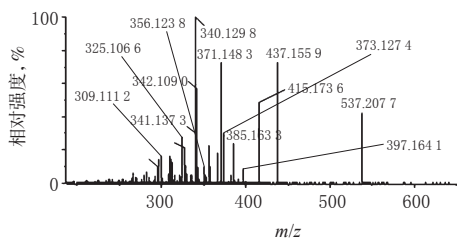


图3 五味子酯甲MS图

Fig 3 MS spectrum of schisantherin A

### 3.2 五味子酯甲代谢产物分析

3.2.1 M1 M1(C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>O<sub>7</sub>),保留时间为21.66 min,正离子准分子离子峰  $m/z$  417.190 8[M+H]<sup>+</sup>,与母药相比相差119 Da;在MS中,母离子分别失去1分子CH<sub>3</sub>和1分子H<sub>2</sub>O形成碎片  $m/z$  402.167 1和  $m/z$  399.180 0,同时失去1分子CH<sub>3</sub>和1分子H<sub>2</sub>O形成碎片  $m/z$  385.163 5;若联苯环断裂母离子失去1分子C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O则形成离子碎片  $m/z$  359.148 8,再分别失去CH<sub>3</sub>、CO和OCH<sub>3</sub>形成系列碎片  $m/z$  344.125 2、331.117 2和328.130 3,继续失去H<sup>+</sup>和CH<sub>3</sub>形成离子  $m/z$  327.122 8和313.107 2;碎片  $m/z$  327.122 8连续失去1分子OCH<sub>3</sub>、CH<sub>3</sub>、CO则产生系列碎片  $m/z$  296.104 3、281.080 8和253.085 7。若连续失去1分子CH<sub>3</sub>和1分子CO形成  $m/z$  269.080 9,再失去1分子CH<sub>3</sub>形成碎片  $m/z$  253.085 7。经与五味子醇乙对照品比较,MS图基本一致,因此推测M1为五味子醇乙。代谢产物M1的化学结构式、MS图见图4、图5。

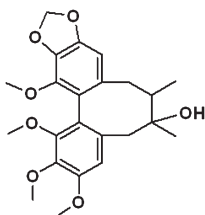


图4 代谢产物M1的化学结构式

Fig 4 Chemical structural formula of M1

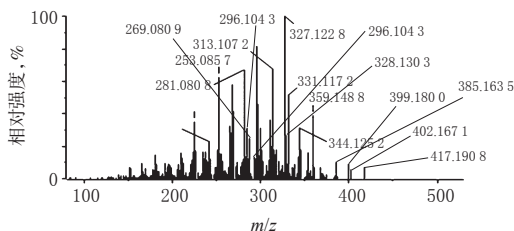


图5 代谢产物M1的MS图

Fig 5 MS spectrum of M1

3.2.2 M2~M5 M2~M5(C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>),正离子准分子离子峰为  $m/z$  403.174 7[M+H]<sup>+</sup>,与M1相比减少14 Da,推测为M1脱甲基后的代谢产物;在MS中,具有相同的裂解规律,母离子连续失去1分子H<sub>2</sub>O、OCH<sub>3</sub>、CH<sub>3</sub>形成碎片  $m/z$  385.162 7、354.145 3、339.122 4;若联苯环断裂母离子失去1分子C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O则形成离子碎片  $m/z$  359;若母离子连续失去2分子CH<sub>2</sub>O形成碎片  $m/z$  343,再继续失去1个或2个CH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>和CO则形成一系列碎片离子  $m/z$  328.129 9、313.248 1、281.079 8。从结构中可以看出,脱甲基的位置可能为1,2,3和14位,因此推测M2~M5可能为1,2,3和14位脱甲基后的产物。采用Chemdraw Ultra 8.0软件计算lg P(P是描述化合物在水相和油相中的分配系数,在具有同分异构体化合物的区分中具有重要的作用。通常lg P值越大,在反相色谱柱上的保留时间越长,说明化合物的疏水性越强)。M2~M5为同分异构体,保留时间分别为22.347、23.372、23.476和24.434 min,根据ChemDraw Ultra 8.0软件计算出M2~M5的lg P值,推测M2为14-OH-五味子醇乙(lg P=3.426 61),M5为2-OH-五味子醇乙(lg P=3.626 61),M3和M4为1-OH-五味子醇乙或3-OH-五味子醇乙,由于二者的lg P同为3.526 61,无法分清具体结构。M2~M5的化学结

构式、MS图见图6、图7。

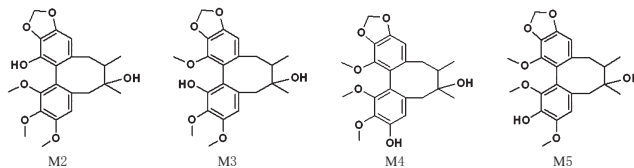


图6 M2~M5的化学结构式

Fig 6 Chemical structural formulas of M2-M5

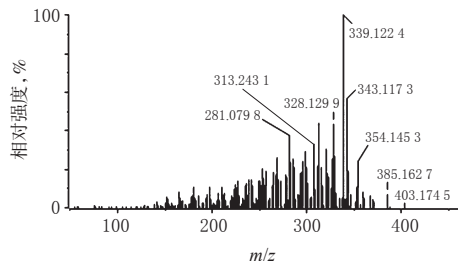


图7 代谢产物M2~M5的MS图

Fig 7 MS spectrums of M2-M5

3.2.3 M6 M6(C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>),保留时间为28.89 min,正离子准分子离子峰  $m/z$  399.179 8[M+H]<sup>+</sup>,与M1相比减少18 Da,推测为M1的水解产物;在MS中,母离子碎裂失去1分子OCH<sub>3</sub>生成碎片  $m/z$  368.161 0,继而分别失去1分子CH<sub>3</sub>和OCH<sub>3</sub>形成离子碎片为  $m/z$  353.138 0和337.143 3;若联苯环断裂,碎片  $m/z$  337.143 3分别失去1分子C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>和C<sub>2</sub>H<sub>10</sub>产生碎片  $m/z$  299.091 4和  $m/z$  255.064 6,提示C7和C8可能存在双键;母离子失去1分子CH<sub>3</sub>后联苯环断裂丢失C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>形成碎片  $m/z$  330.109 8。因此推测M6为7-脱羟基-五味子醇乙。M6的化学结构式、MS图见图8、图9。

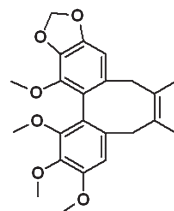


图8 代谢产物M6化学结构式

Fig 8 Chemical structural formula of M6

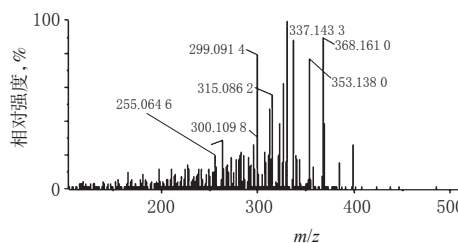


图9 代谢产物M6的MS图

Fig 9 MS spectrum of M6

3.2.4 M7 M7(C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>7</sub>),保留时间为21.77 min,正离子准分子离子峰  $m/z$  431.206 1[M+H]<sup>+</sup>,与M1相比多14 Da,推测可能为M1的甲基化产物;在MS中,母离子分别失去CH<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O、OCH<sub>3</sub>形成碎片为  $m/z$  416.182 0、413.195 0和400.187 6;若母离子同时失去H<sub>2</sub>O和OCH<sub>3</sub>则形成碎片  $m/z$  382.176 8,再继续碎裂失去1分子CH<sub>3</sub>形成碎片367.153 4,失去1分子OCH<sub>3</sub>形

成碎片  $m/z$  351.158 3;当联苯环断裂,母离子失去  $C_7H_{14}O$  形成碎片  $m/z$  315.122 4。7-位OH最易被氧化,因此推测M7为7-甲氧基-五味子醇乙。M7的化学结构式、MS图见图10、图11。

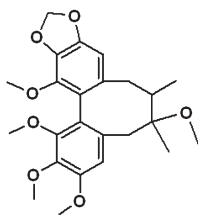


图10 代谢产物M7化学结构式

Fig 10 Chemical structural formula of M7

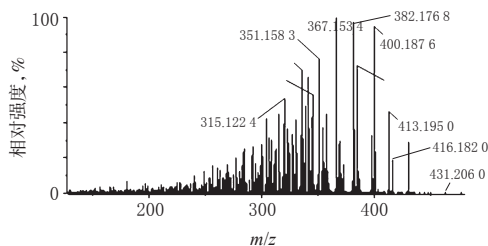


图11 代谢产物M7的MS图

Fig 11 MS spectrum of M7

### 3.3 五味子酯甲的代谢途径

大鼠ig给予五味子酯甲后,在大鼠体内共鉴定五味子酯甲的代谢产物7个,均为I相代谢产物,其代谢途径主要是在脱去苯甲酸后发生氧化反应和还原反应。五味子酯甲在大鼠尿液中的代谢途径见图12。

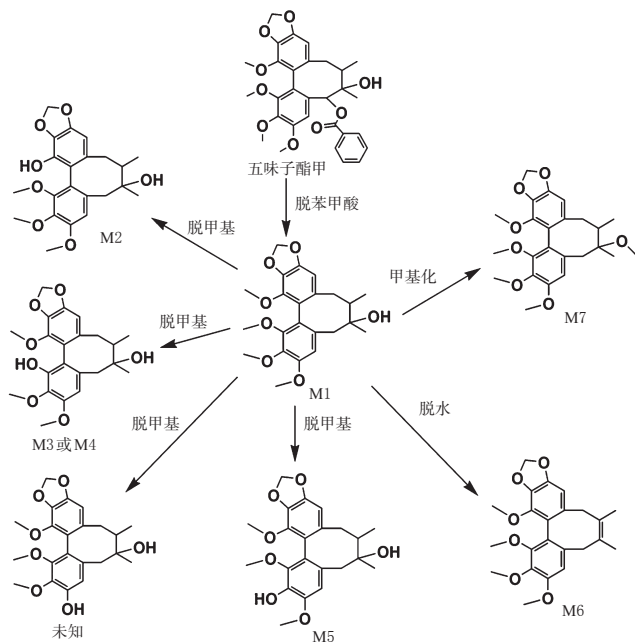


图12 五味子酯甲在大鼠尿液中的代谢途径

Fig 12 Metabolic pathway of schisantherin A in the urine of rats

## 4 讨论

在试验过程中比较了正负离子模式下母药五味子酯甲的质谱裂解信息,结果负离子模式下几乎看不到母药信息,而正离子模式下五味子酯甲具有丰富的质谱碎片信息,更有利于

质谱解析及代谢物的筛选。对比空白尿样和给药后的尿样,发现了新的色谱峰,说明还有新的代谢产物产生,但由于碎片信息量缺乏,无法进行推测,还有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] 胡俊扬,陆兔林,毛春芹,等. HPLC法同时测定不同产地五味子中8种木脂素类成分[J]. 中成药, 2012, 34(2): 313.
- [2] Liu H, Zhang J, Li X, *et al.* Chemical analysis of twelve lignans in the fruit of *Schisandra sphenanthera* by HPLC-PAD-MS[J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(3): 1 234.
- [3] Zhang H, Zhang G, Zhu Z, *et al.* Determination of six lignans in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. fruits and related Chinese multiherb remedies by HPLC[J]. *Food Chem*, 2009, 115(3): 735.
- [4] 李霞,贾晓斌,陈彦,等. 五味子提取工艺的优化研究[J]. 中国药房, 2007, 18(2): 424.
- [5] Wei H, Sun L, Tai Z, *et al.* A simple and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of eight bioactive components and fingerprint analysis of *Schisandra sphenanthera*[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 662(1): 97.
- [6] Guo Y, Han J, Zhang D, *et al.* Aqueous two-phase system coupled with ultrasound for the extraction of lignans from seeds of *Schisandra chinensis* (turcz.) Baill[J]. *Ultrason Sonochem*, 2013, 20(1): 125.
- [7] Liang C, Hu J, Luo R, *et al.* Six new lignans from the leaves and stems of *Schisandra sphenanthera*[J]. *Fitoterapia*, 2013, 86: 171.
- [8] Wang B, Hu J, Tan W, *et al.* Simultaneous quantification of four active schisandra lignans from a traditional Chinese medicine *Schisandra chinensis* (Wuweizi) in rat plasma using liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, doi: 10.1016/j.jchromb.2008.02.016.
- [9] Wei H, Xu W, Cai F, *et al.* Simultaneous determination of five lignan constituents of Wuzhi capsule in rat plasma by LC-MS/MS: application to pharmacokinetic study[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(5): 741.
- [10] Wang YX, Hao HP, Wang GG, *et al.* An approach to identifying sequential metabolites of a typical phenylethanoid glycoside, echinacoside, based on liquid chromatography-ion trap-time of flight mass spectrometry analysis [J]. *Talanta*, 2009, 80(2): 572.
- [11] Prasad B, Singh S. Identification of rat urinary metabolites of rifabutin using LC-MS and LC-HR-MS[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 41(1): 173.
- [12] Liu MY, Zhao SH, Wang ZQ, *et al.* Identification of metabolites of deoxyschizandrin in rats by UPLC-Q-TOF-MS/MS based on multiple mass defect filter data acquisition and multiple data processing techniques[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.12.022.

(收稿日期:2014-07-01 修回日期:2014-10-21)

(编辑:张 静)